

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-242965

(43)Date of publication of application : 27.09.1989

(51)Int.Cl.

G01N 33/50  
C07H 21/04

(21)Application number : 63-070515

(71)Applicant : SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 23.03.1988

(72)Inventor : MURAKAMI AKIRA

## (54) FILM FOR FIXING DNA AND DNA FIXING METHOD

## (57)Abstract:

PURPOSE: To rapidly and efficiently fix trace nucleic acid components to various carrier films by using a photoreactive crosslinking agent having plural functional groups which can be crosslinked to nucleic acid base by UV irradiation.

CONSTITUTION: The material for crosslinking and fixing DNA (e.g. solalene deriv.) having the plural functional groups which can make reaction bonding to the nucleic acid base under photoirradiation and the desired DNA are brought into contact with the film (e.g. nitrocellulose film, nylon film) for depositing DNA previously immobilized with denatured DNA different from the desired DNA and the contact region is irradiated (e.g. for about 10min) by the UV rays (e.g. 320W370nm), by which the desired DNA can be crosslinked to the carrier film and is fixed thereto. The denatured DNA (e.g. the DNA formed by denaturing the DNA of a salmon and herring) signifies one-chain DNA denatured by a heat or alkaline treatment. The nucleic acid is thereby released of the complementary bond and is held exposed. The material for crosslinking and fixing the DNA is eventually crosslinkable to such nucleic base.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-242965

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)9月27日

G 01 N 33/50  
C 07 H 21/04

P-7065-2C

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全4頁)

⑮ 発明の名称 DNA固定用膜およびDNA固定法

⑯ 特 願 昭63-70515

⑰ 出 願 昭63(1988)3月23日

⑱ 発 明 者 村 上 章 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑲ 出 願 人 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

⑳ 代 理 人 弁理士 野河 信太郎

明 和 田 章

1. 発明の名称

DNA固定用膜およびDNA固定法

2. 特許請求の範囲

1. DNA担持用膜に、核酸塩基と光照射下で反応結合しうる官能基を有するDNA架橋固定用物質が基材物質を介してまたは介さずに結合されてなるDNA固定用膜。

2. 請求項1記載のDNA固定用膜に、目的DNAを接触させ、この接触領域に紫外線を照射することにより、上記目的DNAを上記DNA架橋固定用物質に架橋して上記担持用膜に固定することを特徴とするDNA固定法。

3. 目的DNAとは異なる変性DNAが予め固定化されたDNA担持用膜に、核酸塩基と光照射下で反応結合しうる核酸の官能基を有するDNA架橋固定用物質と目的DNAとを接触させ、この接触領域に紫外線を照射することにより、上記目的DNAを上記変性DNAに架橋して上記担持用膜に固定することを特徴とするDNA固定法。

3. 発明の詳細な説明

(イ) 産業上の利用分野

この発明はDNA固定用膜およびDNA固定法に関する。さらに詳しくは、生体中に含まれる微量核酸成分または特定核酸塩基配列の検出法や、DNAプローブによる核酸成分もしくは特定核酸塩基配列を自動的に検出する装置等に好適なDNA固定用膜およびDNA固定法に関する。

(ロ) 従来の技術

生体中の微量核酸成分または特定核酸塩基配列を、例えばコロニー・ハイブリダイゼーション法等によって検出するためには、生体より抽出した核酸(以下目的DNAという)を適当な担持体、例えばニトロセルロース膜等に固定して用いる必要があるが、この固定化には目的DNAと所定の担持体との親和性を確保する点から、通常、真空中85℃で2時間程度の加熱を要する。

(ハ) 発明が解決しようとする課題

しかしながら、上記のごとく固定化に時間のかかる方法では、検出装置の自動化を妨げることと

なり、また価格的にも問題となる。このような問題を解決せんとしてニトロセルロース膜のかわりにナイロン膜を用いる試みもあるが、ナイロン膜に対する蛋白質の非特異的吸着が、一般に用いられているニトロセルロース膜に比べて大きいため、例えば酵素を用いた検出法に適さない等の問題点がある。

この発明はかかる状況に鑑みなされたものであり、種々の担持膜に微量核酸成分を、短時間にかつ効率良く固定するDNA固定用膜およびDNA固定法を提供しようとするものである。

## (二) 問題を解決するための手段

かくしてこの発明によれば、DNA担持用膜に、核酸塩基と光照射下で反応結合しうる官能基を有するDNA架橋固定用物質が基材物質を介してまたは介さずに結合されてなるDNA固定用膜、並びに、このDNA固定用膜に目的DNAを接触させ、この接触領域に紫外線を照射することにより、上記目的DNAを上記DNA架橋固定用物質に架橋して上記担持用膜に固定することを特徴とする

ターゲットDNAを固定する方法も提供できることとなる。すなわちこの発明は、目的DNAとは異なる変性DNAが予め固定化されたDNA担持用膜に、核酸塩基と光照射下で反応結合しうる複数の官能基を有するDNA架橋固定用物質と目的DNAとを接触させ、この接触領域に紫外線を照射することにより、上記目的DNAを上記変性DNAに架橋して上記担持用膜に固定することを特徴とするDNA固定法をも提供することができる。すなわちこれは変性DNAを、ターゲットDNAを架橋固定する際の一方の架橋端として用いる方法である。この変性DNAとは熱またはアルカリ処理により変性された1本鎖DNAを意味する。すなわち1本鎖DNAとすることにより核酸塩基は相補的な結合が解かれて剥き出しの状態にされており、これらの核酸塩基に対して上記DNA架橋固定用物質が架橋できうることとなる。上記変性DNAとしては、後に固定されるターゲットDNAの塩性質およびこの固定されたターゲットDNAへの塩反応を阻害しないものであればいずれ

DNA固定法が提供される。

この発明は、紫外線照射により核酸塩基と架橋形成しうる複数の官能基を有する光反応性架橋剤を用いることにより、短時間で目的DNA（以下ターゲットDNAという）を担持用膜に固定できることを特徴とする。

この発明に用いるDNA担持用膜は、通常当該分野で公知のものを用いることができ、例えばニトロセルロース膜、ナイロン膜等が挙げられる。

この発明のDNA固定用膜には、上記担持用膜に予めDNA架橋固定用物質が結合される。この結合は上記担持用膜に直接化学的・物理的になされていてもよく、また基材物質を介してなされていてもよい。ここで基材物質とは担持用膜に容易に固定化でき、かつ、固定化後においてDNA架橋固定用物質との結合手を有しており、さらにターゲットDNAの分析・反応等を阻害しない物質をいい、例えば変性DNA等が挙げられる。このような変性DNAを用いる場合、この変性DNAを予めDNA担持用膜に固定化した膜を用いて、

を用いるものであっても良く、例えばサケ、ニシン等のDNAを変性して用いることができる。これらの変性DNAを前記担持用膜上に固定する場合は、従来の固定法を用いて行われる。このことは後述する実施例の記載が参照される。

この発明に用いる上記DNA架橋固定用物質としては、2箇所以上の光反応性部位を有し、かつ、これらの部位が紫外線により反応して核酸塩基と架橋を形成しうる構造を有する化合物が選択される。この化合物としてはクマリン誘導体、とりわけピリミジン塩基と特異的に反応しうるものとして知られているソラレン誘導体が挙げられる。従ってこのソラレン誘導体を用いることにより、前記のごとく固定された1本鎖DNAのチミン、シトシンおよびウラシルのそれぞれの塩基塩基と架橋できることとなる。

この発明の方法はまた、前記変性DNAに予め上記DNA架橋固定用物質をその一部の官能基により架橋結合した後、これを前記担持用膜に固定して用いられるものであっても良い。

この発明において予め皮性DNAが固定された担持用膜上に、ターゲットDNAを固定するには紫外線照射により行われる。用いられる紫外線としては、長波長領域のもの例えば、320~370nmが選択される。上記紫外線の照射時間は、ターゲットDNA等に応じて多少異なるが、従来と同等の固定度であれば短時間、例えば10分程度で達成される。またこの発明の方法による固定法の利点としては、上記紫外線照射により目的DNAが固定された担持膜に、短波長領域の紫外線、例えば254nm等を照射することにより、この固定を解除することができる。すなわち固定化操作を可逆的に行わせることが可能となる。

#### (\*) 作用

この発明によれば、担持用膜に予め固定されたDNA担持固定用物質上に目的DNAを接触してこれらに紫外線照射すると、上記DNA担持固定用物質の官能基が紫外線の影響で目的DNAの塩基と反応してこれらの間に架橋が形成され、これによって上記目的DNAが担持膜上に固定され

上記乾燥したDNA固定ニトロセルロース膜上に置いた後、この膜が乾かないうちに光反応架橋剤としてソラレン誘導体溶液(トリメチルソラレン: 10mM溶液)を10 $\mu$ l加え、5分間放置した。その後この膜をそのまま紫外線(UV)照射装置(短波長366nm)により3分間、室温下でUV照射に付した。照射処理後、この膜を20mMリン酸緩衝液(50℃)で10分間洗浄した後風乾し保存した。

#### (i) DNAの検出

上記のごとくニトロセルロース膜に固定されたM13ファージDNAは、DNAプローブ(5'末端を<sup>32</sup>PでラベルしたM13ファージDNA用ユニバーサルプライマ)を用いたドット・ハイブリダイゼーション法により検出できた。このとき検出効率は従来法に比べて遜色なかった。

上記のことから、光反応架橋剤による固定後もM13ファージDNAは適当なプローブで検出できることを示しており、この発明の固定法が有効であることを示している。

ることとなる。

以下実施例によりこの発明を詳細に説明するが、これによりこの発明は限定されるものではない。

#### (へ) 実施例

##### 実施例 I

##### (i) DNA固定用担持膜の作製

シュライヒャー&シュメル(Schleicher & Schuell)社製のニトロセルロース膜(1×5cm)を、20mMのリン酸緩衝液に予め湿潤させておく。一方10 $\mu$ g/mlのサケ精子DNAを20mMリン酸緩衝液中で100℃で5分間加熱しその後直ちに水水中で冷却して、皮性(1本鎖)DNA溶液に調製する。この1本鎖DNA溶液に上記ニトロセルロース膜を湿潤させ、50℃で1時間加熱した後、この膜を低リン酸緩衝液で洗浄し、80℃真空下、2時間加熱する。この膜は低リン酸で洗浄した後風乾する。

##### (i) 固定(前処理)

M13ファージDNA(1 $\mu$ g/10 $\mu$ l)(外部DNA)を、スポットが直径5mm以下になるように、

##### (i) 外部DNA固定効率

1. 上記(i)と同様の方法により作製したサケDNA固定ニトロセルロース膜(ただし、6 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>膜)上に、上記(i)と同様の方法(ただしUV照射時間: 5分間)により、<sup>32</sup>PでラベルしたM13ファージDNA(以下外部DNAという)を固定するときの外部DNA固定率を、種々の濃度のソラレン誘導体(同上)溶液を用いて調べたところ、第1図に示す結果が得られた。

上記結果によれば、外部DNA固定率はソラレン誘導体の濃度依存性を有することが示されている。

II. ニトロセルロース(以下NCと略す)膜へのサケDNA固定(すなわち上記(i)の操作、以下前処理という)の有無および前処理方法の相違による外部DNAの固定率について調べた結果を下記(表1)に示す。

NC膜として下記4種のもの:

予めソラレン誘導体(同上)との光架橋反応を行わせたサケDNAを用いて前処理したN

C膜(No.1)；

上記(i)と同様に前処理しそこにソラレン誘導体(同上)を添加したNC膜(No.2)；

上記(i)と同様に前処理しソラレン誘導体を添加しないNC膜(No.3)；

前処理しないNC膜(No.4)

についてそれぞれ、上記(i)と同様の方法(ただしUV照射時間：5分間)で処理して得られた各外部DNA固定NC膜のオートラジオグラムから、外部DNA固定率を求めた。

なお、上記IおよびIIのいずれの場合も、  
外部DNA固定率 = (固定DNA量(UV5分間照射) / 固定DNA量(U未照射))として求めた。

〔表1〕NC膜への外部DNAの紫外線固定

NC膜 No.	外部DNA 固定効率
1	2.07
2	1.86
3	1.40
4	1.43

上記〔表1〕の結果によれば、ソラレン誘導体を用いることにより紫外線照射によるNC膜への外部DNAの固定が率良く行われることが示されている。

#### (ト)発明の効果

この発明によれば、目的DNAを簡便に固定できるDNA固定用膜を提供することができる。また目的DNAを担持膜上に簡便かつ短時間に固定することができる。またこれによりDNAプローブ検査装置の自動化に付随する問題点を解消することができる。

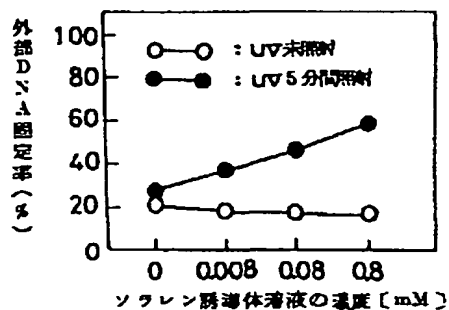
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図はこの発明の方法における外部DNA固定率と光反応担持剤の濃度との関係を示すグラフ図である。

代理人 弁理士 野 河 慎太郎



第 1 図



Best Available Copy